Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 849-861

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص.۸۶۱-۸۴۹

مقاله پژوهشی

پایداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس در برابر تیمارهای حرارتی و pH

رکسانا علیزاده فیروزه[۱]- مهتا میرزایی[*۲]- وجیهه فدایی نوغانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۲

چکیده

در این‌تحقیق‌از آنزیم‌آلکالاز تحت‌شرایط کنترل شده (نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۰ آنسون/ کیلوگرم پروتئین، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، یک ساعت) برای هیدرولیز پروتئین عدس (*Lens esculinaris*) استفاده شد. پیشرفت هیدرولیز آنزیمی با روش OPA و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS ارزیابی شدند. در ادامه اثر حرارت‌دهی (دماهای ۳۷، ۵۰، ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ تا ۶۰ دقیقه)، ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و اثر pH (۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۱به مدت ۱ ساعت) بر پایداری فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس بر پایه مهار رادیکال های DPPH و ABTS بررسی شد و میزان گروه‌های آمین‌آزاد، با روش OPA ارزیابی گردید. نتایج نشان دادند حرارت‌دهی در دماهای ۳۷، ۵۰، و۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه به‌ترتیب ۱/۲۵، ۴/۹ و ۱۰/۱۷درصد کاهش در فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (P<۰/۰۵) و ۳/۸، ۶/۸ و ۹ درصد کاهش در فعالیت مهاررادیکالABTS (P<۰/۰۵) را موجب شد. علاوه بر آن در تمام تیمارهای حرارتی با افزایش زمان، اثر تیمارهای حرارتی تشدید شد. نتایج ارزیابی میزان گروه‌های‌آمین آزاد نیز نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) در میزان گروه‌های‌آمین‌آزاد در محصول هیدرولیز پروتئینی بود. نتایج اثر تیمارهای pH بر پایداری پپتیدها نیز نشان داد که هر دو شرایط pH اسیدی و قلیایی باعث کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها گردید. به‌طوریکه در pH=۲ افت۱۶/۳ درصدی و pH=۱۱ افت ۲۹/۲درصد ودر فعالیت مهار رادیکال DPPH در pH ۲ افت ۱۶درصدی در pH ۱۱ ۱۸/۲درصد افت در فعالیت مهاررادیکال ABTS مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پایداری، پروتئین عدس، تیمارحرارتی، تیمار pH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محصول هیدرولیز پروتئینی.

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان به دلیل حفظ و ارتقا سلامت فردی، تمایل زیادی به مصرف فرآورده‌هایی دارند که به سلامت آن‌ها کمک نموده و باعث پیشگیری از بروز برخی بیماری‌ها از جمله دیابت، سرطان، فشارخون می‌گردد (Jian *et al.*, 2007). تغذیه یکی از عوامل مهم در حفظ سلامت بشر می‌باشد. بنابراین تغذیه نامناسب می‌تواند اثرات منفی بر سیستم ایمنی بدن داشته باشد.تنوع محصولات غذایی‌فرآوری شده در طول قرن گذشته، به همراه نیاز به محصولات غذایی ایمن‌تر، راحت‌تر و متنوع تر، به‌طور نمایی افزایش پیدا کرده است(Mine *et al.*, 2010). در این میان حبوبات از جمله عدس از منابع غذایی سرشار از پروتئین هستند که دارای پتانسیل بالایی برای تولید محصولات هیدرولیز پروتئینی حاوی پپتیدهای زیست فعال می‌باشند (de Castro *et al.*, 2015). پپتیدهای زیست فعال اجزای پروتئینی خاص و ویژه‌ای می‌باشند که جرم مولکولی آنها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون و معمولا دارای ۲-۲۰ اسیدآمینه در توالی خود هستند (Mendis *et al.*, 2005).

استفاده بهینه از محصولات هیدرولیز پروتئینی حاوی پپتیدهای زیست فعال، به‌عنوان ترکیبات فراسودمند و سلامتی‌بخش در فرمولاسیون مواد غذایی و تولید در مقیاس‌صنعتی به عواملی چون سازگاری با ماتریس‌های مختلف غذایی، دسترسی‌زیستی و پایداری آنها بستگی دارد (Abdul- Hamid *et al.*, 2002). عوامل نظیر تیمار حرارتی و تغییرات pH از تیمارهای رایج در صنایع غذایی می‌باشند و از طرفی بر اساس مطالعات قبلی جزء عوامل مهم تاثیرگذار بر پایداری پپتیدهای زیست‌فعال می باشند (Rao *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2016).

محصولات هیدرولیز پروتئینی دارای ویژگی‌های متفاوتی نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدفشار خون می‌باشند که تحت تاثیر عواملی نظیر نوع اسیدهای‌آمینه، طول‌زنجیره پپتیدی و توالی اسیدهای‌آمینه قرار می‌گیرند (Maqsoudlou *et al.*, 2019). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مقرون به صرفه هستند و کارایی بالایی

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجو کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mahtam86@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i5.87854

دارنـد. با این‌حال، استفاده از آنها در مواد غذایی، به دلیل خطرات احتمالی و سمی بودن‌آن‌ها در داخل بدن، محدود یا ممنوع شده است. بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های با منشا طبیعی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. در تحقیق حاضر پایداری خاصیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس در شرایط تغییرات تیمار حرارت و pH مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

عدس[1] از بازار محلی تهیه شد، آنزیم آلکالاز با فعالیت Au/kg protein ۲/۴ از شرکت نوونزایم [2](دانمارک)، ۱-۱ دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH[3])، ۲ و۲ آزینو بیس ۳- اتیل‌بنزوتیازولین – ۶ سولفونیک‌اسید (ABTS) [4] از شرکت سیگما (آمریکا) و سرم‌آلبومین‌گاوی (BSA)[5]، لوسین، ارتوفتال دی‌آلدئید (OPA)، سولفات مس، سدیم تترابورات، سود سوزآور، معرف فولین و سدیم پتاسیم تارتارات از شرکت مرک‌آلمان خریداری شدند.

تهیه ایزوله پروتئین از دانه عدس

دانه‌عدس (واریته *Lens esculinaris*) از بازار محلی تهیه شد و توسط آسیاب برقی آرد شد. سپس به‌منظور تهیه ایزوله پروتئینی ابتدا ۲۰۰ گرم آرد با ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس pH در ۹ با استفاده از سود ۰/۱ مولار تنظیم و سپس مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد همزده و در g× ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Raymandt.N.Co، آلمان) و فاز رویی جمع‌آوری شد. pH فاز رویی با اسید هیدروکلریک ۱ مولار در ۴/۳ تنظیم و مخلوط در g× ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در انتها رسوب‌ها جمع‌آوری شدند و مجددا در آب به‌صورت سوسپانسیون درآمده و برای هیدرولیز آنزیمی در شرایط سرما نگهداری شد (de Castro *et al*., 2015).

هیدرولیز ایزوله پروتئین دانه عدس

به‌منظور هیدرولیزآنزیمی، به ایزوله پروتئینی آماده شده (pH با استفاده از بافر فسفات ۵ میلی‌مولار در مقدار ۸ تنظیم شد)، آنزیم آلکالاز (با فعالیت۲/۴ آنسون بر میلی‌لیتر) اضفه شد. برای این منظور نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۰ آنسون/ کیلوگرم پروتئین در نظر گرفته شد و سپس هیدرولیزآنزیمی در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار(Comecta، اسپانیا) با دور ۱۲۰ rpm انجام شد. نمونه‌برداری در فواصل زمانی صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰ ،۱۲۰،۱۸۰ دقیقه انجام شد. سپس نمونه به‌منظور غیرفعال شدن آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. سپس به‌منظور حذف رسوبات احتمالی نمونه سانتریفوژ (g× ۵۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه) و دمای یخچال نگهداری شد (Ovissipour *et al*., 2009).

تیمار حرارتی

تیمار حرارتی به مدت ۱۵ دقیقه در دماهای ۳۷، ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰درجه سانتی‌گراد انجام شد. از طرف دیگر اثر متقابل دما و زمان نیز اندازه‌گیری شد. بر این اساس نمونه‌ها در دماهای ۳۷، ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند سپس نمونه‌برداری در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه انجام شد. سپس بعد از سرد شدن نمونه‌ها به‌منظور حذف رسوبات سانتریفوژ (g× ۵۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه) انجام شد ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس وزن یکسان از پروتئین در نمونه‌ها اندازه گیری شد(Escudero *et al*., 2014).

تیمار pH

نمونه پروتئین هیدرولیز شده تحت pHهای مختلف۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ به مدت ۱ساعت قرار گرفت و بعد از تنظیم pH در میزان خنثی و سانتریفوژ کردن نمونه، پایداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. در مقالات مشابه دیگری نیز برای بررسی پایداری پپتیدها از همین روش استفاده شده است. (Zhu *et al*., 2014؛ Wong *et al*., 2019).

اندازه‌گیری پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در نمونه‌های مورد آزمون، از روش‌لوری استفاده شد. در روش لوری، محلول A از ترکیب ۱ سی‌سی سولفات مس (۱٪)، ۱ سی‌سی سدیم پتاسیم‌تارتارات (۲٪)، ۴۹ سی‌سی سود ۰/۱ نرمال و ۴۹ سی‌سی کربنات سدیم ۲٪ تهیه شد. در زمان آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۲/۵ سی‌سی از محلول (ریجنت) A مخلوط شد و بلافاصله ورتکس و ۱۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول فولین رقیق شده (به نسبت۱:۱ با آب) به هر نمونه اضافه و بلافاصله ورتکس شد. بعد از گذشت۲۰ دقیقه میزان‌جذب نور در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد BSA[6] و بر حسب میلی‌گرم/ میلی‌لیتر گزارش شد (Lowry *et al*., 1951). به‌منظور رسم منحنی استاندارد از پروتئین BSA استفاده شد. ابتدا رقت‌های مختلف (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰،

1 *Lens esculinaris*
2 lenox company
3 1,1-dipheny-2-picrylhydrazyl
4 2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid
5 Bovin serum albumin
6 .Bovin serum albumin

۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) تهیه و با استفاده از روش لوری میزان پروتئین محلول محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان گروه‌های آمین آزاد به روش OPA

محلول ارتو فتال‌آلدئید از ترکیب ۲۵ سی‌سی سدیم تترابورات (۱۰۰میلی مولار)، ۲/۵ سی‌سی سدیم دسیل سولفات (۲۰٪)، ۴۰ میلی‌گرم ماده ارتوفتال آلدئید در ۵۰۰ میکرولیتر متانول و ۱۰۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول با اب مقطر به حجم ۵۰ سی‌سی به‌صورت تازه و روزانه تهیه شد. در زمان آزمایش، ۲۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با یک سی‌سی از محلول تهیه شده مخلوط شد و بلافاصله ورتکس و ۲ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شد. سپس ۱ سی‌سی آب مقطر اضافه شد و جذب نمونه‌ها در ۳۴۰ نانومتر قرائت گردد. منحنی استاندارد لوسین با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ترسیم سپس با استفاده از منحنی استاندارد لوسین با ضریب همبستگی ۰/۹۹ مقدار گروه‌های آمین آزاد براساس میکرومول لوسین به ازای میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Church *et al.*, 1983).

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH، ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۰۲٪ DPPH در اتانول ۹۹/۵ درصد مخلوط شد. سپس مخلوط واکنش در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر با روش طیف‌سنجی اندازه‌گیری شد. نمونه کنترل نیز به همین طریق تهیه شد با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH بر اساس فرمول زیر و به ازای وزن مشخصی از پروتئین گزارش شد (Brand-Williams *et al.*, 1995).

(۱) ۱۰۰× (جذب کنترل/ (جذب نمونه- جذب کنترل))=درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

ابتدا محلول استوک رادیکال ABTS از ABTS (۷ میلی‌مولار) با پرسولفات پتاسیم (۲/۴۵ میلی‌مولار) تهیه و در دمای یخچال برای مدت ۱۶-۱۷ ساعت، نگهداری شد. سپس حجمی از محلول استوک (محلول سبز آبی) با بافر فسفات (۵ میلی‌مولار، pH=۷) تا رسیدن به میزان جذب ۰/۰۲±۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۲۵ در ادامه ۲۵ میکرولیتر از نمونه (غلظت محلول پروتئینی ۰/۸۶ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) با ۱ سی‌سی معرف ABTS مخلوط شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در دمای اتاق میزان جذب در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌کنترل نیز به همین طریق تهیه شد با این تفاوت که به جای نمونه از آب‌مقطر استفاده شد.درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS بر اساس فرمول زیر و به‌ازای وزن مشخص از پروتئین گزارش شد (Aleman *et al.*, 2011).

(۲) (۱۰۰× جذب کنترل/ (جذب نمونه- جذب کنترل))=درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار، انجام شدند. رسم نمودارها و آنالیز آماری (به روش One-way ANOVA, Two-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها توسط تست Turkeys multiple و به کمک نرم‌افزار graphpad prism 8 انجام شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد.

نتایج و بحث

میزان پروتئین استخراج شده از دانه عدس

میزان پروتئین‌کل اندازه‌گیری شده از دانه عدس(۲۰۰ گرم پودر عدس در ۱۰۰۰ ملیی‌لیتر آب مقطر) به روش کلدال برابر ۲۴/۶٪ براساس میزان ازت‌کل و به ازای وزن خشک اندازه‌گیری شد. پیش از این Urbano و همکاران (۲۰۰۷) بیان داشتند که عدس غنی از پروتئین، کربوهیدرات، موادمعدنی و غیره می‌باشد که بر این اساس آن‌ها میزان پروتئین‌کل‌عدس را ۲۰ -۳۱٪ به ازای وزن خشک و میزان ازت کل گزارش کردند (Urbano *et al.*, 2007). این میزان با محتوای پروتئینی نمونه مورد آزمایش در این تحقیق مطابقت داشت.

هیدرولیز آنزیمی ایزوله پروتئین عدس

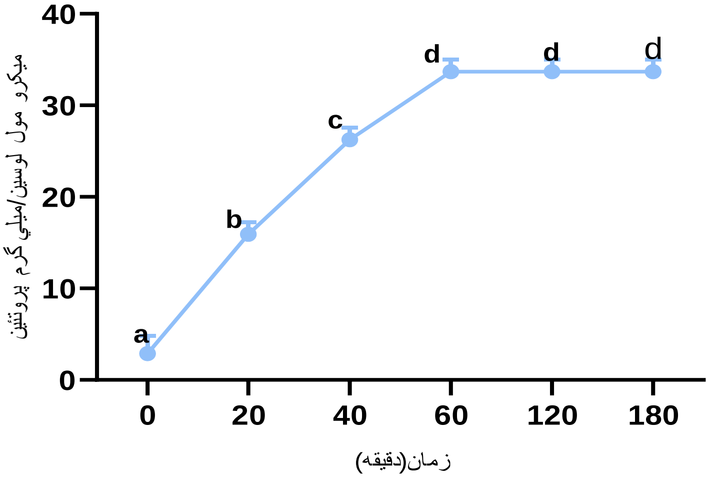
نتایج مربوط به میزان محتوای‌گروه‌های‌آمین‌آزاد در طی زمان‌های مختلف در شکل ۱ ارائه شده است. همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، میزان گروه‌های‌آمین‌آزاد در نمونه هیدرولیز شده به‌وسیله آنزیم آلکالاز از همان دقایق ابتدایی روند افزایشی داشته است و از ۲/۸۷ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین در دقیقه صفر به ۳۳/۶۶ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین در دقیقه ۶۰ رسیده است. سپس با ادامه فرآیند هیدرولیز تا دقیقه ۱۸۰ روند ثابتی را طی کرده است. نتایج نشان می‌دهند که میزان‌آنزیم و سوبسترای پروتئینی بر پیشرفت هیدرولیز آنزیمی تاثیر می‌گذارند. بنابراین بعد از مدت زمان مشخص آنزیم با کمبود سوبسترا مواجه می‌شود و بنابراین سرعت پیشرفت هیدرولیز آنزیمی کند می‌شود. آنزیم آلکالاز در پیشرفت هیدرولیز آنزیمی نقش موثری دارد. محققین مختلف دلیل این امر را توانایی بالای آنزیم‌آلکالاز بیان داشتند. آنزیم آلکالاز توانایی بالایی در شکستن

اتصالات پپتیدی بین اسیدآمینه‌های هیدروفوب را دارد. (رجب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۷).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس

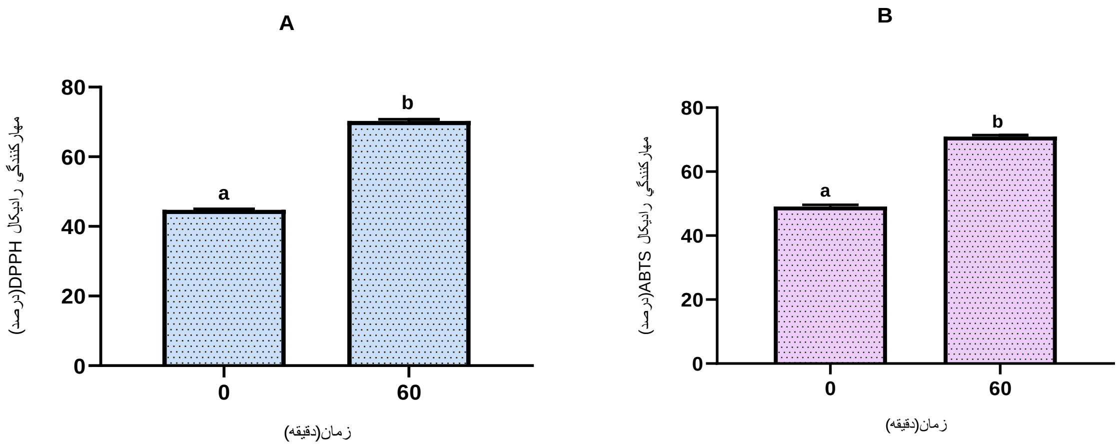
بعد از بررسی اثر هیدرولیز آنزیمی بر میزان گروه‌های‌آمین آزاد اینبار فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس در شروع و پایان مرحله هیدرولیزآنزیمی (بر اساس مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS) بررسی شد و نتایج در شکل ۲ ارائه شده است.

همانگونه که در شکل ۲ (A) مشاهده می‌شود، درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در محلول پروتئینی عدس (با غلظت پروتئین ۰/۸۶ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر پروتئین) در زمان صفر ۴۴/۷۸٪ می‌باشد و این مقدار در زمان ۶۰ دقیقه، ۷۰/۳۰٪ می‌باشد. درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS (شکل ۲ (B)) در زمان صفر ۴۹/۰۷٪ می‌باشد که این میزان در دقیقه ۶۰، ۷۰/۹۶٪ می‌باشد. نتایج حاکی از آن است که آنزیم آلکالاز نقش موثری در تولید پپتیدها با خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و ABTS دارد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها تا حد زیادی تحت تأثیر ترکیب اسیدآمینه، طول زنجیره و آبگریز بودن پپتیدها است. (Liu *et al.*, 2017).



شکل ۱- بررسی هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس به‌وسیله آنزیم‌آلکالاز در طی زمان‌های مختلف با روش OPA.

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.



شکل ۲- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس براساس مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS در طی زمان‌های صفر و ۶۰ دقیقه.

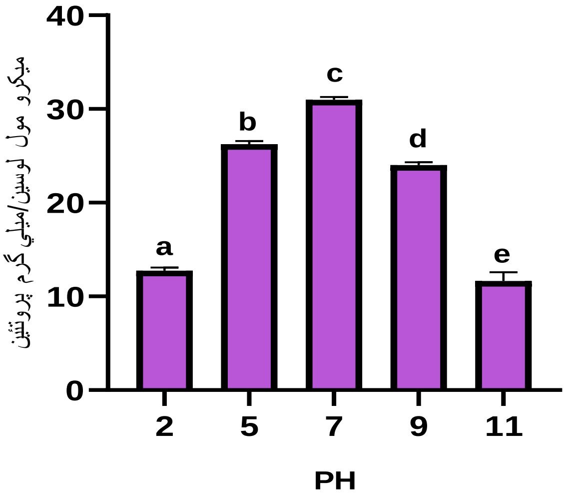
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.

بنابراین بر اساس مطالعات قبلی حدس‌زده می‌شود که ظرفیت مهارکنندگی محصولات هیدرولیز پروتئینی می‌تواند تحت تاثیر عواملی نظیر اندازه، میزان اسیدآمینه‌های‌آبگریز و غلظت مواد اهداکننده الکترونی در محصول هیدرولیز پروتئینی باشد (Liu *et al.*, 2017). علاوه برآن نتایج نشان دادند که میزان مهار رادیکال ABTS به‌طور معناداری بالاتر از میزان مهار رادیکال DPPH بود. محققان دلیل این تفاوت را حلالیت و انتشار پپتیدها در محیط واکنش و همچنین واکنش‌پذیری بیشتر رادیکال‌هایABTS با ترکیبات آنتی‌اکسیدان در مقایسه با رادیکال‌های DPPH عنوان کردند (Bamdad *et al.*, 2011).

بررسی اثر pH بر پایداری پپتیدها

اثر pH بر محتوای گروه‌های آمین آزاد در محصول هیدرولیز پروتئینی

بعد از تولید محصول هیدرولیز پروتئینی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل قبول، پایداری آنها تحت تیمار pH مورد ارزیابی قرار گرفت. در ابتدا اثر این تیمار بر محتوای گروه‌های‌آمین‌آزاد بررسی شد. نتایج در شکل ۳ گزارش شده است. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در pH ۷ بالاترین میزان‌گروه‌های‌آمین‌آزاد اندازه‌گیری شد.



شکل ۳- بررسی اثر pHهای ۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ (به مدت ۱ ساعت در دمای محیط) بر محتوای گروه‌های آمین آزاد حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس

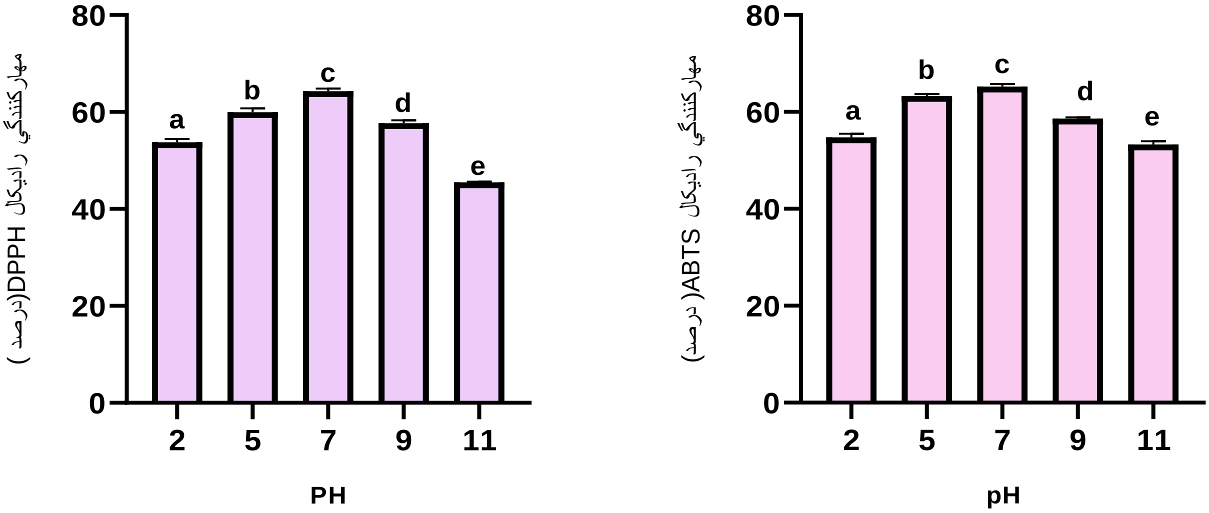
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.

به‌طوری که مقدار آن ۳۰/۹۷ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری گردید. سپس قرار گرفتن به مدت یک ساعت در شرایط pHهای اسیدی و قلیایی باعث کاهش محتوای‌گروه‌های‌آمین‌آزاد بطور معناداری در نمونه پروتئینی شد ($p<0.05$). به‌طوریکه مقدار آن در pHهای ۵ و ۲ به‌ترتیب به مقادیر ۲۶/۲۵ و ۱۲/۷۶ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین و در pHهای ۹و ۱۱ به‌ترتیب به مقادیر ۲۴/۰۰ و ۱۱/۶۴ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید.

اثر تغییرات pH بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در محصول هیدرولیز پروتئینی

بعد از بررسی اثر تغییرات pH بر محتوای گروه‌های‌آمین آزاد در مرحله دوم اثر تغییرات pH بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH و ABTS در محصول هیدرولیز پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت.

فعالیت پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل از پروتئین عدس تحت تیمارهای مختلف pH بر اساس دو مکانیسم مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS و DPPH مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس نمونه‌ها در pH ۷ بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند و میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH مقدار ۶۴/۲۸ درصد اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که در شکل ۴ قسمت (A) مشاهده می‌شود قرار گرفتن نمونه‌ها به مدت یک ساعت در شرایط pHهای اسیدی و قلیایی سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بر اساس مهار رادیکال DPPH شده است. به‌طوریکه مقدار آن در pHهای اسیدی ۵ و ۲ به‌ترتیب به مقادیر ۵۹/۹۵ و ۵۳/۷۷ و در pHهای قلیایی ۹ و ۱۱ به‌ترتیب به مقادیر ۵۷/۷۰ و ۴۵/۵۰ رسید. بنابراین میزان افت در فعالیت مهار رادیکال DPPH در نمونه‌های قرار گرفته به مدت یک ساعت در شرایط pH ۲ و ۱۱ به‌ترتیب ۱۶/۳و ۲۹/۲ درصد محاسبه شد.



شکل ٤- بررسی اثر pHهای ۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ (به مدت ۱ ساعت در دمای محیط) بر فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال‌هایABTS و DPPH) و پایداری پپتیدهای آنتی‌اکسیدان حاصل از پروتئین عدس.

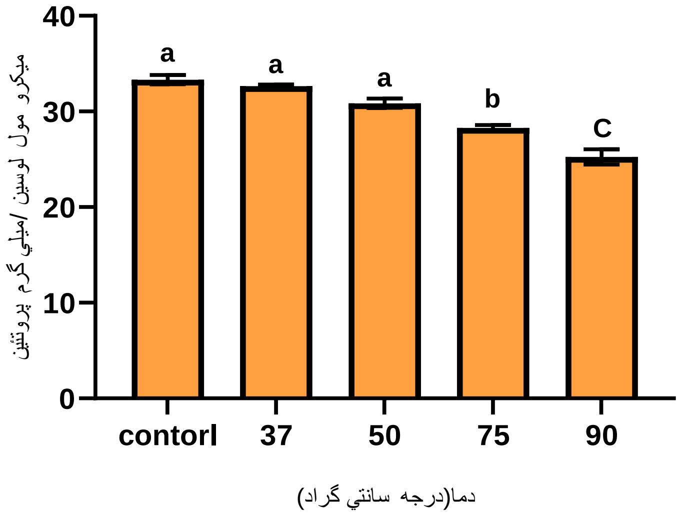
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.

همانگونه که در شکل ۴ قسمت (B) مشاهده می‌شود نمونه‌ها در pH ۷ بامقدار ۶۵/۲۰ درصد ، بالاترین تاثیر را در مهار رادیکال‌آزاد ABTSرا نشان دادند. سپس قرار گرفتن نمونه‌ها در pHهای اسیدی و قلیایی سبب کاهش فعالیت پپتیدهای آنتی‌اکسیدان (بر اساس مهار رادیکال آزاد ABTS) به‌طور معناداری شده‌اند ($p<0.05$). بر این اساس فعالیت پپتیدهای آنتی‌اکسیدان (مهار رادیکال آزاد ABTS) در pHهای ۵، ۹، ۲ و ۱۱ به مقادیر ۶۳/۲۸، ۵۸/۶۰، ۵۴/۷۶ و ۵۳/۳۰ رسید. بنابراین افت ۳، ۱۰، ۱۶ و ۱۸/۲درصدی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب مهار رادیکال ABTS در pHهای ۵، ۹، ۲ و ۱۱محاسبه شد. اعتقاد بر این است که پروتئین‌ها از ترکیبات حساس به تغییر pH بوده و از میزان فعالیت این ترکیبات درpHهای بسیار بالا یا پایین کاسته شده و ممکن است دچار تغییر حالت یا غیرفعال شدن دائمی شوند. با توجه به ماهیت پروتئینی پپتیدها، می‌توان کاهش نسبی در پایداری پپتیدها و یا کاهش یا افزایش شدید درpH را با تجمع زیاد بارهای همنام در این محدوده از pH و تاثیر این تجمع بر ساختمان پپتید مرتبط دانست (Nalinanon *et al.*, 2011). Kentnawa و همکاران (۲۰۱۷) دلیل این امر را تخریب در قطعات پپتید در اثرpH اسیدی یا قلیایی بیان داشتند (Kentnawa *et al.*,2017). Zhu و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقی که بر ژامبون جینهوا انجام دادند، گزارش کردند که عوامل مختلفی وجود دارد که باعث از بین‌رفتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط قلیایی می‌شود. یکی از دلایل بروز واکنش راسمیک شدن (چرخش مولکول‌ها خلاف همدیگر) است. در شرایط قلیایی احتمالاً واکنش‌های راسمیک شدن رخ می‌دهد. احتمالاً هنگامی که پپتیدها در شرایط قلیایی قرار داشته باشند، واکنش راسمیک شدن رخ می‌دهد. یکی دیگر از دلایل از بین‌رفتن فعالیت می‌تواند نتیجه واکنش deamidation باشد. در مقادیر بالاتر pH و در نتیجه تغییر در ساختار و ترکیب و از بین رفتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شود. احتمال سوم این است که انرژی فعال‌سازی تخریب پپتید با تغییر pH متفاوت است. به‌طور کلی، هر پپتید دامنه pH مناسب خود را دارد. در طول این محدوده pH، ساختار و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً پایدار است (Zhu *et al.*, 2014).

بررسی اثر حرارت بر پایداری پپتیدها

بررسی اثر تیمار حرارتی بر محتوای گروه‌های آمین آزاد در محصول هیدرولیز پروتئینی

نمونه‌های پروتئینی تهیه شده از مراحل قبل، بعد از فرآیند هیدرولیز آنزیمی مطابق فصل مواد و روش‌ها تحت تیمارهای حرارتی (دماهای۳۷، ۵۰، ۷۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه) قرار گرفتند. به‌منظور بررسی اثر تیمارهای‌حرارتی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها در گام نخست اثر هر یک از تیمارهای حرارتی را بر میزان محتوای گروه‌های آمین‌آزاد در محصولات هیدرولیز پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۵- بررسی اثر تیمارهای حرارت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بر میزان گروه‌های آمین آزاد در محصول هیدرولیز پروتئین عدس و مقایسه با نمونه کنترل (دارای آنزیم فاقد تیمار

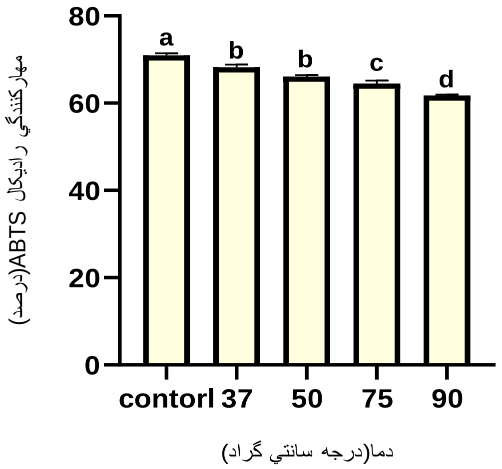
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.

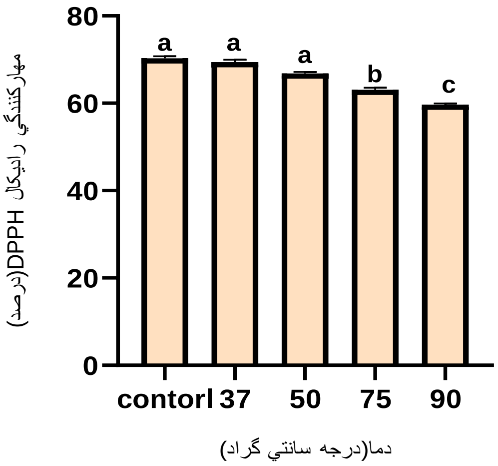
نتایج ارائه شده نشان می‌دهند که نمونه‌های تیمار داده شده دارای مقادیر متفاوتی از گروه‌های آمین آزاد هستند. همانگونه که در شکل۵ مشاهده می‌گردد میزان گروه‌های‌آمین‌آزاد در نمونه‌ای که تحت تیمار حرارتی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته است نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود و مقدار آن به میزان ۳۲/۶۵ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. میزان گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه تیمار شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با نمونه کنترل اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد ($p>0.05$). میزان گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه‌هایی که تحت تیمار حرارتی، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند با اندکی کاهش همراه بود و به ۳۰/۸۵ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. نتایج نشان دادند که میزان گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه‌هایی که تحت تیمار ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵دقیقه قرار گرفته بودند اختلاف معناداری با نمونه کنترل مشاهده نمی‌شود ($p>0.05$). همانگونه که در شکل بالامشاهده می‌شود میزان گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه‌های تحت تیمار ۷۵ درجه سانتی‌گراد به ۲۸/۲۷ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید که به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) کمتر از نمونه کنترل بود. نتایج بیانگر این است که تیمار نمونه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سبب کاهش ۱۵/۱۸ درصدی محتوای گروه‌های آمین آزاد نسبت به نمونه کنترل شد. نمونه‌هایی که تحت تیمار حرارتی ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته بودند در اثر دمای بالا و شرایط نامطلوب بخش زیادی از نمونه‌ها تبخیر شدند بدین منظور فرآیند تیمار حرارتی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اعمال شد. که بر این اساس میزان گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه‌های تحت تیمار ۹۰ درجه سانتی‌گراد ۲۵/۲۴ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید. نتایج نشان دادند که تیمارنمونه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به‌طور معناداری نسبت به نمونه‌کنترل با کاهش همراه بود ($p<0.05$). نتایج بیان داشتند که تیمار نمونه‌ها در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد سبب کاهش محتوای گروه‌های آمین آزاد به‌صورت چشمگیری شد (حدود ۲۴/۲۷ درصد).

بررسی اثر تیمار حرارتی بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در محصول هیدرولیز پروتئینی

بعد از بررسی اثر تیمارهای حرارتی بر میزان محتوای گروه‌های آمین‌آزاد در گام دوم اثر هریک از تیمارهای حرارتی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها براساس مهار رادیکال DPPH و ABTS مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به‌صورت نمودار زیر گزارش شد. بعد از فرآیند هیدرولیزآنزیمی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از پروتئین عدس بر اساس مهار رادیکال آزاد DPPH تحت تیمارهای حرارتی مورد بررسی قرار گرفت. براین اساس نمونه‌ها در دماهای ۳۷ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند و به‌ترتیب به مقادیر ۶۹/۴۲ و ۶۶/۸۵ رسید. تیمار نمونه‌ها در دمای ۳۷ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه نسبت به نمونه کنترل اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد ($p>0.05$). بنابراین به‌ترتیب افت ۱/۲۵و

۴/۹ درصدی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها محاسبه شد. سپس قرار گرفتن نمونه‌ها در حرارت‌های ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها براساس مهار رادیکال DPPH شد. به‌طوریکه مقدار آن ۶۳/۰۸ درصد رسید. بنابراین افت ۱۰/۱۷درصدی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب مهار رادیکال DPPH در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد محاسبه شد. تیمار نمونه‌ها در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه همان‌گونه که پیش از این توضیح داده شد ناپایدار بود به همین منظور نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شدند. که بر این اساس میزان مهار رادیکال DPPH مقدار ۵۹/۷۱ اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها تحت دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به‌طور معناداری ($p<0.05$) نسبت به نمونه دارای آنزیم (کنترل) کاهش یافت. که بر اساس این ۱۵ درصد افت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها براساس مهار رادیکال DPPH محاسبه گردید.





شکل ٦- بررسی اثر تیمارهای حرارت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از پروتئین عدس و با نمونه کنترل (دارای آنزیم فاقد تیمار).
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.

همانگونه که در شکل ۶ (B) مشاهده می‌شود نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بالاترین تاثیر را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال ABTS) را نشان دادند و میزان فعالیت آن ۶۸/۲۰ اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند که قرارگرفتن نمونه‌ها تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سبب کاهش اندکی (۳/۸ درصد) در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها نسبت به نمونه کنترل شد. قرارگرفتن نمونه‌ها تحت دماهای ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها (بر اساس مهار رادیکال‌آزاد ABTS) به‌طور معناداری شدند ($p<0.05$). بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها (برحسب مهار رادیکال آزاد ABTS) در دماهای ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب مقادیر ۶۶/۱۲، ۶۴/۵۱ و ۶۱/۷۵ اندازه‌گیری شد. بنابراین میزان افت در فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS در نمونه‌های قرار گرفته به مدت ۱۵ دقیقه در دماهای ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۶/۸ و۹ درصد محاسبه شد. میزان افت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه قرار گرفته به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد ۱۳درصد محاسبه گردید. آن‌ها دلیل امر را اینگونه بیان کردند که پپتیدها با وزن مولکولی‌کم، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارند. از طرف دیگر پپتیدها از ترکیبات حساس به حرارت می‌باشند و طی فرآیندهای حرارتی آسیب‌پذیر هستند و در نهایت فرآیندهای حرارتی سبب تجمع انهاها می‌شود(Pokorny and Schmidt, 2001; Escudero *et al.*, 2014). Fu و همکاران (۲۰۱۵) دلیل این تغییرات کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اثر حرارت را با تغییرات اسیدهای آمینه و وزن مولکولی محصولات هیدرولیز پروتئینی در طول عملیات حرارتی مرتبط دانستند. Pokorny و Schmidt (۲۰۰۱) بیان کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با وزن مولکولی کم در دمای و زمان بسیار کم پایدار است. به‌طور کلی، در برابر گرما آسیب‌پذیر هستند و منجر به آگلوتینه شدن (به‌هم‌چسبندگی و تجمع) می‌شوند.

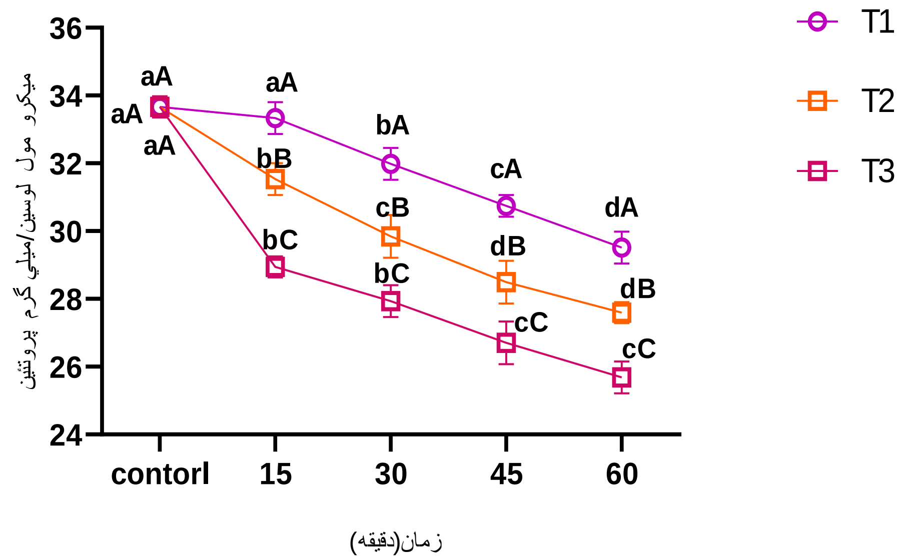
بررسی اثر متقابل دما وزمان بر پایداری پپتیدها

اثر متقابل دما و زمان بر محتوای گروه‌های آمین آزاد در محصول هیدرولیز پروتئینی

بعد از بررسی فرآیند هیدرولیز آنزیمی و تاثیر تیمار حرارت در یک زمان ثابت، اینبار نمونه‌ها به‌منظور ارزیابی محتوای گروه‌های‌آمین آزاد

تحت تیمارهای حرارتی (۳۷، ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد) در زمان‌های مختلف (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) بررسی شدند.

همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود قرار گرفتن محصول هیدرولیز پروتئینی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (T1) در زمان‌های مختلف سبب کاهش میزان محتوای گروه‌های آمین‌آزاد شد به نحوی که در ۱۵ دقیقه اول از ۳۳/۶۶ به‌۳۳/۳۳ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید اما این تغییرات معنادار نبود ($p>0.05$). سپس در دقیقه ۳۰ با کاهش بیشتری همراه بود و به ۳۱/۹۸ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. سپس در دقایق ۴۵ و ۶۰ نیز روند کاهشی داشت و به‌ترتیب ۳۰/۷۴و ۲۹/۵۱ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. قرار گرفتن نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف سبب کاهش محتوای گروه‌هایآمین‌آزاد نسبت به نمونه کنترل شد. میزان محتوای گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه قرار گرفته شده در معرض دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (T2) در زمان‌های مختلف کاهش یافت به نحوی که در ۱۵ دقیقه اول فرآیند از ۳۳/۶۶ به ۳۱/۵۳ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. سپس در دقایق ۳۰، ۴۵ و ۶۰ نیز با کاهش همراه بود و به‌ترتیب ۲۹/۸۴، ۲۸/۴۹ و ۲۷/۵۹ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. میزان محتوای گروه‌های آمین‌آزاد حاصل از تیمار نمونه به‌وسیله دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در طول زمان‌های مختلف اختلاف معناداری را با نمونه کنترل نشان می‌دهد ($p<0.05$). نتایج ارائه شده در نمودار بالا نشان می‌دهد که میزان محتوای گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه قرار گرفته شده در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T3) در طول زمان‌های مختلف روند کاهشی داشته به‌طوری که در دقیقه ۱۵ از ۳۳/۶۶ به ۲۸/۹۴ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. سپس با کاهش روند همراه بود و در دقایق ۳۰ و ۴۵ به‌ترتیب ۲۷/۹۳ و ۲۶/۷۰ میکرومول/ میلی‌گرم پروتئین رسید. سپس دوباره در ۶۰ دقیقه روند کاهشی داشته و به ۲۵/۶۸ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. میزان محتوای گروه‌های آمین‌آزاد در نمونه قرار گرفته شده در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) کمتر از نمونه کنترل بود. بنابراین نتایج نشان دادند که قرارگرفتن نمونه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف نسبت به سایر دماها (۳۷ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد) سبب کاهش بیشتر محتوای گروه‌های آمین آزاد شد.



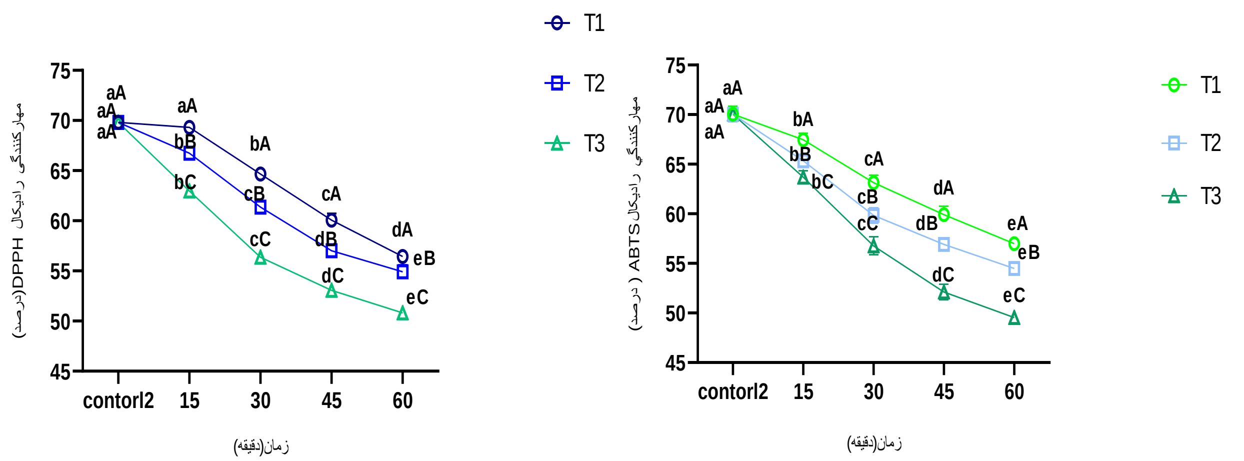
شکل ۷- بررسی اثر تیمارهای حرارت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (T1)، ۵۰ درجه سانتی‌گراد (T2) و ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T3) در زمان‌های مختلف بر محتوای گروهای آمین آزاد و مقایسه با نمونه کنترل (دارای آنزیم فاقد تیمار)

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.

اثر متقابل دما و زمان بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در محصول هیدرولیز پروتئینی

همانگونه که در شکل ۸ (A) مشاهده می‌گردد قرار گرفتن نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بر اساس مهار رادیکال DPPH شد. بر این اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها از دقایق ابتدایی تا دقیقه ۶۰ روند کاهشی داشت به‌نحوی که تا دقیقه ۶۰ به ۵۶/۴۴ رسید. بنابراین میزان افت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دقیقه ۶۰ نسبت به نمونه کنترل (دارای آنزیم و بدون تیمار) ۱۹/۱۴ درصد محاسبه شد. بر اساس نمودار بالا (A) قرار گرفتن نمونه‌ها تحت دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (T2) در طول

زمان‌های مختلف سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بر اساس مهار رادیکال DPPH شد. همانطور که مشاهده می‌شود میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از دقیقه ۱۵ با کاهش همراه بود به‌طوری که به ۶۶/۷۴ رسید. سپس این روند کاهشی در دقایق ۳۰ و ۴۵ نیز ادامه داشته و به مقدار ۶۱/۳۵ و ۵۷/۰۰ رسید. سپس در دقیقه ۶۰ نیز با کاهش همراه بود و به مقدار ۵۴/۹۱ رسید. بنابراین میزان افت در فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در نمونه‌های قرار گرفته در معرض دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در طی بازه زمانی مختلف (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) به‌ترتیب ۴/۳، ۱۲/۱، ۱۸/۳ و ۲۱/۳ درصد محاسبه گردید. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها (بر اساس مهار رادیکال DPPH) در نمونه‌های قرار گرفته شده در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T3) در طول زمان‌های مختلف از همان ابتدا با کاهش همراه بود به‌طوری که در دقایق ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ به‌ترتیب به مقادیر ۶۲/۹۶، ۵۶/۳۶، ۵۳/۰۵ و ۵۰/۸۰ رسید. بر این اساس در دقایق ۱۵ و ۶۰ افت ۹/۷ و۲۷/۲درصدی محاسبه شد.



شکل ۸- بررسی اثر تیمارهای حرارت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (T1)، ۵۰ درجه سانتی‌گراد (T2) و ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T3) در زمان‌های مختلف بر پایداری پپتیدهای آنتی‌اکسیدان براساس مهار رادیکال DPPH و ABTS و مقایسه با نمونه کنترل (دارای آنزیم و فاقد تیمار).
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌ها است.

همانگونه که در شکل ۸ (B) مشاهده می‌شود، میزان مهار رادیکال آزاد ABTS در نمونه کنترل ۲ به ۷۰/۰۴ رسید. سپس میزان مهار رادیکال آزاد ABTS در نمونه قرارگرفته شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (T1) در دقیقه ۱۵ کاهش یافت و به ۶۷/۴۵ رسید سپس در دقایق ۳۰، ۴۵ و ۶۰ به‌ترتیب به مقادیر ۶۳/۱۲، ۵۹/۹۰ و ۵۶/۹۹ کاهش یافت. براین اساس نتایج نشان دادند که قرارگرفتن نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول زمان‌های مختلف (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) به‌ترتیب سبب کاهش ۳، ۱۰، ۱۴ و ۱۸ درصدی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها (بر اساس مهار رادیکال ABTS) شده است. میزان فعالیت پپتیدهای آنتی‌اکسیدان حاصل از پروتئین عدس بعد از قرار گرفتن در معرض دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (T2) در طول زمان‌های مختلف کاهش یافت. به‌طوری که از دقایق ابتدایی تا دقیقه ۶۰ روند کاهشی داشت و به ۵۴/۴۸ رسید. بنابراین میزان افت تا دقیقه ۶۰، ۲۲/۲درصد محاسبه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از پروتئین عدس براساس مهار رادیکال‌آزاد ABTS در نمونه‌های قرار گرفته شده در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T3) از ۷۰/۰۴ در نمونه کنترل ۲ به ۶۳/۶۷ در دقیقه ۱۵ کاهش یافت. سپس در دقیقه ۳۰ به مقدار ۵۶/۷۶ رسید. سپس در دقایق ۴۵ و ۶۰ به مقادیر ۵۴/۱۲ و ۴۹/۵۲ کاهش یافت. نتایج حاکی از آن است که فعالیت پپتیدهای آنتی‌اکسیدان بر اساس مهار رادیکال ABTS در نمونه‌های قرار گرفته شده در معرض دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در طول زمان‌های مختلف نسبت به سایر دماها (دمای ۳۷ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد) کاهش بیشتری داشته است. در تحقیقی که Kiokias و همکاران (۲۰۰۷) بر روی پایداری ایزوله پروتئین آب پنیر در برابر تیمارحرارتی (۸۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد) انجام دادند بیان داشتند که تغییر شکل پروتئین آب پنیر ناشی از تیماردهی حرارت در دماهای ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. که تغییرات مولکولی در ساختار پروتئین عمدتا به دلیل قرار گرفتن اسیدهای آمینه در کنار هم و همچنین قرار گرفتن پروتئین‌ها در دماهای بالا (به‌ویژه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) سبب دناتوراسیون آن‌ها می‌گردد. کاهش میزان گروه‌های سولفیدریل در ساختار پروتئین باعث ضعیف شدن نیروهای درون و بین مولکولی در ساختار پروتئین می‌شود. از طرف دیگر با کاهش پیوند دی‌سولفیدی میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد

افزایش می‌یابد.آن‌هاگزارش کردند میزان پیوند دی‌سولفیدی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، با کاهش همراه بود. بنابراین میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. ولی با افزایش بیشتر درجه حرارت (بالای ۸۰ درجه سانتی‌گراد) در طی تیماردهی، واکنش‌عکس‌عمل کرده و سبب کاهش میزان مهار رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (Kiokias *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که آنزیم آلکالاز نقش به‌سزایی در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از پروتئین عدس دارد. از طرفی بررسی پایداری پپتیدها در طول نگهداری امری بسیار مهم تلقی می‌شود. زیرا امروزه اکثر فرآیندهایی که در صنایع‌غذایی به‌منظور فرآوری موادغذایی استفاده می‌شود از جمله پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و غیره که معمولا در محدودی دمایی ۱۲۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین تغییرات pH در محدوده ۱۱-۳ انجام می‌شود تاثیر به‌سزایی در فعالیت پپتیدهای زیست‌فعال دارد. عواملی نظیر بسته‌بندی، حرارت، میزان اکسیژن، نور، pH و... همگی به نحوی بر ساختار پپتیدها و عملکردشان تاثیرگذار هستند. در نتیجه، می‌توانند به‌عنوان یک منبع جدید برای جلوگیری از واکنش‌های اکسیداسیون در فرآوری موادغذایی و تقویت خواص آنتی‌اکسیدانی غذاهای کاربردی مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین می‌توان از آن‌ها در تغذیه ورزشکاران، غنی‌سازی نوشیدنی‌ها، فرمولاسیون غذای‌کودک و .... استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از همکاری جناب آقای دکتر مهدی‌ملک‌پور کارشناس محترم آزمایشگاه گیاهان‌دارویی دانشگاه‌آزاداسلامی واحد شهر قدس در انجام مراحل آزمایشگاهی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abdul-Hamid, A., Bakar, J., Bee, G.H., 2002. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food chemistry* 78, 69-74.

Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M., Montero, P., 2011. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry* 125, 334-341.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology* 28, 25-30.

Bamdad, F., Wu, J., Chen, L., 2011. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science* 54, 20-28.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L., 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66, 1219-1227.

de Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International* 74, 185-198.

Escudero, E., Mora, L., Toldrá, F., 2014. Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and in vitro digestion. *Food chemistry* 161, 305-311.

Jian, L., Lee, A., Binns, C., 2007. Tea and lycopene protect against prostate cancer. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 16, 453-457.

Kiokias, S., Dimakou, C., Oreopoulou, V., 2007. Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. *Food Chemistry* 105, 94-100.

Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., Rawdkuen, S., 2017. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. *Food chemistry* 215, 383-390.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Total protein estimation by Lowry's method. *J. Biol. Chem* 193, 265.

Lai, T., Lin, Z., Zhang, R., Guo, X., Ma, Z., Liao, W., Hu, X., 2016. Processing stability of antioxidant protein hydrolysates extracted from degreased walnut meal. *International Journal of Food Engineering* 2, 155-161.

Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.-K., 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 581-587.

Mine, Y., Li-Chan, E., Jiang, B., 2010. Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals. John Wiley & Sons.

Maqsoudlou, A., Mahoonak, A.S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., Ghorbani, M., 2019. Peptide identification in alcalase hydrolysated pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food research international* 116, 905-915.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., Shahidi, F., 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry* 124, 1354-1362.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E., Molla, A.E., 2009. Use of hydrolysates from yellowfin tuna Thunnus albacares fisheries by-product as a nitrogen source for bacteria growth media. *International Aquatic Research* 1, 73-77.

Pokorný, J., Schmidt, S., 2001. Natural antioxidant functionality during food processing. Antioxidants in food, 331-350.

Rao, S., Sun, J., Liu, Y., Zeng, H., Su, Y., Yang, Y., 2012. ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food chemistry* 135, 1245-1252.

Rajabzadeh M, Pour-Ashuri P., Shabanpour B, Alishahi A. 1397. Evaluation of Applied and Antioxidant Properties of Hydrolyzed Sperm Protein Egg Protein. (Oncorhyynchus mykiss) *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 10: 35-23.

Sharma, N., Singh, N., Singh, O., Pandey, V., Verma, P., 2011. Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24, 479-484.

Urbano, G., Porres, J.M., Frías, J., Vidal-Valverde, C., 2007. *Nutritional value, Lentil. Springer*, pp. 47-93.

Wong, F.-C., Xiao, J., Michelle, G., Ong, L., Pang, M.-J., Wong, S.-J., Teh, L.-K., Chai, T.-T., 2019. Identification and characterization of antioxidant peptides from hydrolysate of blue-spotted stingray and their stability against thermal, pH and simulated gastrointestinal digestion treatments. *Food chemistry* 271, 614-622.

Zhu, C.-Z., Zhang, W.-G., Kang, Z.-L., Zhou, G.-H., Xu, X.-L., 2014. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham. *Meat science* 96, 783-789.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 849-861

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص.۸۶۱ -۸۴۹

Antioxidant activity stability of Lentil protein hydrolysate against heat and pH treatments

R. Alizadeh Firoozeh[1], M. Mirzaei[2*], V. Fadaei Noghani[3]

Received: 2020.07.21
Accepted: 2020.11.12

Introduction: Bioactive peptides are protein fragments with 2 to 20 amino acids that have different biological properties depending on the type of amino acids and peptide sequences, including antioxidant, antihypertensive, and antidiabetic. These peptides are inactive in their parent protein sequences but are released during fermentation, enzymatic hydrolysis, or food processing, and exhibit a positive effect on body function and health being. Lentil protein hydrolysate containing antioxidant peptides can be considered as an ingredient of functional foods. One major challenge in using protein hydrolysate in the formulation of functional foods is their stability against the various processes applied to food such as heat and pH treatments.

Materials and Methods: In this study, Lentil protein (*Lens esculinaris*) was hydrolyzed by Alcalase enzyme under controlled conditions (enzyme/substrate ratio of 90 Anson unit (AU)/ kg protein, 55°C, one hour). The intensity of enzymatic hydrolysis was monitored by the OPA method and antioxidant activity was evaluated based on DPPH and ABTS radical scavenging activity. The heat stability of lentil protein hydrolysate was evaluated by heating samples at 37, 50, 75 (for 15 -60 min), and 90°C (for 5 minutes). The pH stability was investigated by exposing the sample at a pH of 2, 5, 7, 9, And 11 for 1 hr and then adjusting on 7. OPA method was also used to evaluate the possible effect of pH and heat treatments on the content of free amino groups.

Results and Discussion: The results showed that hydrolysis of Lentil protein by Alcalase under controlled conditions produced antioxidant peptides. Heating at 37, 50, and 75°C for 15 minutes reduced the DPPH radical scavenging activity by 1.25, 4.9, and 10.17% and ABTS radical scavenging activity by 3.8, 6.8, and 9%, respectively. The results of the OPA assay also showed a significant ($P<0.05$) decrease in the number of free amino groups in protein hydrolysate exposed to heat treatment. With increasing the time of treatment up to 60 minutes, the antioxidant activity decreased more significantly ($P<0.05$), simultaneously with a decrease in the content of free amino acid groups in the protein hydrolysate sample. So that, after heat treatment at 37, 50, and 75 ° C for 60 minutes, the free amino acid groups reached from 33/66 µM leucin /mg protein to 29.51, 27.59, and 25.68 µM leucin /mg protein and the most decrease in antioxidant activity was measured for samples exposed to 75°C for 60 minutes. It caused a 27.2%, and 29.2% reduction in DPPH and ABTS radical scavenging activity, respectively. Also, exposure to heat treatment at 90°C for 5 minutes caused a 15% and 13% decrease in DPPH and ABTS radical scavenging activity. The results obtained from consideration the antioxidant activity of samples exposed to pH treatment (2, 5, 7, 9, and 11 for 1 hour) showed the highest antioxidant activity of peptides at neutral pH and confirmed that acidic and alkaline conditions caused a significant decrease in antioxidant activity ($P<0.05$). As exposure to pHs 2 and 11 for one hour led to respectively 16.3 and a 29.2% decrease in DPPH radical scavenging activity and 16 and 18.2% decrease in ABTS radical scavenging activity. The results of the OPA assay also confirmed the role of acidic and basic pH on less exposure of free amino acid groups in protein structure.

The results showed the potential of using Alcalase enzyme to hydrolyze Lentil protein and produce antioxidant peptides and the Lentil protein hydrolysate with antioxidant activity exhibited relative stability toward different heat and pH treatments. It was concluded that peptides retained 88% and 76% of antioxidant activity at maximum heat (90 ° C for 5 minutes) and pH treatment (pH=11, for 1 hour). According to the results of the OPA assay, the observed decrease in antioxidant activity may be due to the changes that happen in protein and peptide structure when are exposed to heat and pH treatments. Altogether, our results showed that Lentil protein hydrolysate can be considered as a potential food ingredient with stable antioxidant activity.

Keywords: Stability, Lentil protein, Thermal treatment, pH treatment, Antioxidant activity, Protein hydrolysate.

1, 2 and 3. MSc Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
(Corresponding Author E-mail: mahtam86@gmail.com)